

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 08320313 A

(43) Date of publication of application: 03 . 12 . 96

(51) Int. Cl

G01N 30/88
G01N 33/53
G01N 33/92

(21) Application number: 07077450

(71) Applicant: OKAZAKI MIYO SASAMOTO
KEIKO

(22) Date of filing: 03 . 04 . 95

(72) Inventor: OKAZAKI MIYO
SASAMOTO KEIKO

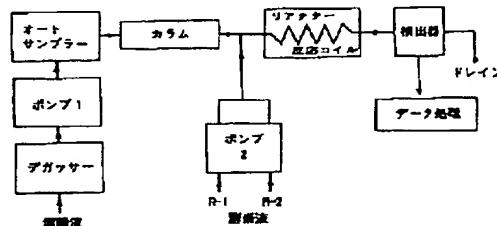
(54) DIAGNOSTIC METHOD OF LIPOPROTEIN
DYSBOLISM DISEASE

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a diagnostic method in which a lipoprotein dysbolism symptom can be diagnosed precisely and simply by obtaining a lipoprotein profile which expresses the relationship between a cholesterol (TC) amount in a lipoprotein sorted by a particle size, a triacylglycerol(TG) amount and the grain size.

CONSTITUTION: The serum, of a patient, which has been set on an autosampler is poured into a column, and a lipoprotein is sorted in the order of the magnitude of a particle size by an eluent which is sent from a pump 1. After that, an enzyme reagent is sent continuously into an eluate from the column from a pump 2, it is colored inside a reactor, TC is detected, and a chromatogram which indicates the elution time and a TC amount is created automatically. In addition, the apparatus is used as it is, TG is determined, the eluate in the column is distributed into two groups, and the TC and the TG are determined simultaneously by one operation. Chromatograms of both are overlapped, a lipoprotein profile is created so as to be compared with a protein profile obtained from a normal person, and a lipoprotein dysbolism symptom is diagnosed.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-320313

(43)公開日 平成8年(1996)12月3日

(51)Int.Cl.⁶
G 0 1 N 30/88
33/53
33/92

識別記号 庁内整理番号

F 1
G 0 1 N 30/88
33/53
33/92

技術表示箇所
J
W
Z

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全16頁)

(21)出願番号 特願平7-77450

(22)出願日 平成7年(1995)4月3日

(71)出願人 595048049

岡崎 三代

千葉県市川市市川3丁目28-5 ナガサキ
ヤハビテーション603

(71)出願人 595048050

笹本 恵子

東京都杉並区永福3丁目26番8号

(72)発明者 岡崎 三代

千葉県市川市市川3丁目28-5 ナガサキ
ヤハビテーション603

(72)発明者 笹本 恵子

東京都杉並区永福3丁目26番8号

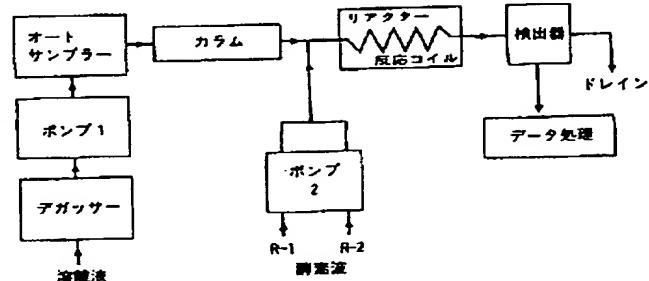
(74)代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

(54)【発明の名称】 リポ蛋白代謝異常疾患の診断方法

(57)【要約】 (修正有)

【構成】以下の工程：(a) HPLCゲル濾過クロマトグラフィーによって生体試料中のリポ蛋白を粒子サイズの順に分離する工程、(b) 分離後のリポ蛋白に含まれるコレステロール及びトリアシルグリセロールの定量とを行う工程、及び(c) リポ蛋白の粒子サイズとコレステロール及びトリアシルグリセロールの含有量との関係を示すリポ蛋白プロファイルを得る工程を含むリポ蛋白代謝異常症の診断方法。

【効果】 血清リポ蛋白の特徴を的確に把握でき、リポ蛋白代謝異常症を正確に診断できる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程：

(a) HPLCゲル濾過クロマトグラフィーによって生体試料中のリポ蛋白を粒子サイズの順に分離する工程、(b) 分離後のリポ蛋白に含まれるコレステロール及びトリアシルグリセロールの定量とを行う工程、及び(c) リポ蛋白の粒子サイズとコレステロール及びトリアシルグリセロールの含有量との関係を示すリポ蛋白プロファイルを得る工程を含むリポ蛋白代謝異常症の診断方法。

【請求項2】 上記工程(c) に続き、以下の工程：

(d) 上記工程(c) において得られたリポ蛋白プロファイルを健常者から得たリポ蛋白プロファイルと比較することによりリポ蛋白代謝異常症の疾患に特徴的なリポ蛋白の性状を把握する工程を含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】 上記工程(c) に続き、以下の工程：

(d) 上記工程(c) において得られたリポ蛋白プロファイルを、健常者及び各種リポ蛋白代謝異常症の患者から得た複数の標準的リポ蛋白プロファイルを含むリポ蛋白プロファイル・ライブラリーと比較する工程を含む請求項1に記載の方法。

【請求項4】 大サイズリポ蛋白分画と小サイズリポ蛋白分画を完全に分離し、各々のリポ蛋白プロファイルを比較する請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 HPLCゲル濾過クロマトグラフィーによって分離された生体試料中のリポ蛋白の粒子サイズと該分離後のリポ蛋白に含まれるコレステロール量及びトリアシルグリセロール量との関係を表すリポ蛋白代謝異常症診断用のリポ蛋白プロファイル。

【請求項6】 リポ蛋白代謝異常症の疾患に特徴的なリポ蛋白の性状を把握するために用いる請求項5に記載のリポ蛋白プロファイル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はリポ蛋白代謝異常症の診断方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒト等の哺乳類動物から採取した生体試料に含まれるリポ蛋白を高速液体クロマトグラフィーにより分離し、分離後のリポ蛋白中のコレステロール及びトリアシルグリセロールを定量した後、生体試料中のリポ蛋白の粒子サイズとコレステロール量及びトリアシルグリセロール量との関係を表すリポ蛋白プロファイルを作製することにより、脂質代謝異常症の診断を行う方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 リポ蛋白は、トリアシルグリセロールやコレステロールエステルなどの中性脂質をコア部とし、その表面が固有の蛋白質（アポリポ蛋白質）とリン脂質、及び遊離コレステロールからなる被膜で包まれたミセル様の小粒子であり、疎水性の脂質に蛋白質が結合することにより血流中に安定な輸送体として存在してい

る。

【0003】 リポ蛋白は、その粒子の大きさ、水和密度、及び電気泳動度などの性質の違いにより幾つかのグループに分類されており、基本的には、粒子に含まれる蛋白質と脂質との比率によって規定される水和密度に従い、軽いものから、CM（カイロミクロン）、VLDL（超低密度リポ蛋白： $d < 1.006$ ）、LDL（低密度リポ蛋白： $1.006 < d < 1.063$ ）、HDL（高密度リポ蛋白： $1.063 < d < 1.210$ ）に分類されている。この他、VHDL（超高密度リポ蛋白）やIDL（中密度リポ蛋白）と呼ばれる分類もある。例えば HDLに分画されたリポ蛋白群に含まれるコレステロール及びトリアシルグリセロールは、それぞれ HDLコレステロール及び HDLトリアシルグリセロールと呼ばれる。

【0004】 最近のリポ蛋白の分析法の進歩・発展によってリポ蛋白代謝に関する研究が目ざましく進展し、多くのリポ蛋白代謝異常症の病態が明らかにされている。例えば、血清のコレステロール(TC)値やトリアシルグリセロール(TG)値によって高脂血症の型分類がなされており、虚血性心疾患、動脈硬化症、脳血管障害、各種代謝異常症との合併症などとの関連が研究されている。このような研究から、HDLコレステロールが末梢組織から肝臓へコレステロールを運搬する作用を有しており、抗動脈硬化作用を示すことが明らかにされている。

【0005】 リポ蛋白の分析法としては、従来、超遠心分離により密度の大きな血漿蛋白を沈降させ、逆に密度の小さなリポ蛋白を浮上させる超遠心法が知られている。この方法によって特定の比重のリポ蛋白分画を採取し、それらの分画に含まれるコレステロール量、トリアシルグリセロール量、血清蛋白（マクログロブリンやアルブミン等）量と各種疾患との相関を調べた臨床的な研究が数多く報告されている。しかしながら、超遠心法によって低比重から高比重までの広い範囲にわたる血清リポ蛋白の全体的な分布を調べるには、分画遠心法によって密度溶媒を低いものから順に高くしながら遠心を繰り返してCM、VLDL、LDL、HDLを順次分離する必要があり（段階的分画浮上法）、大量の血液試料と非常な長時間と要するという問題があった。

【0006】 また、段階的分画浮上法では、血漿中のリポ蛋白の比重分布が連続的で切れ目がないことから、段階的分画の際の密度誤差が段階をおって増幅されてしまうという問題があり、溶媒密度の調製に細心の注意が必要である。さらに、遠心後の試料チューブから目的のリポ蛋白を採取する操作には非常な熟練を要するという問題がある。とりわけ、トリアシルグリセロールを多量に含むリポ蛋白は遠心チューブ内壁に付着し易いので定量性を確保できないという問題があり、この方法の致命的な欠陥となっている。従って、超遠心法によって幅広い分布を有するリポ蛋白中のトリアシルグリセロールを正確かつ簡便に定量することは实际上不可能である。

【0007】一方、リポ蛋白の粒子サイズは、一般に4～600 nm程度の広い範囲に分布しているので、この粒子サイズの違いから分子ふるい効果を利用してリポ蛋白の分離・分画を行うゲル濾過クロマトグラフィー法が開発されている。このようなゲル濾過クロマトグラフィー法のうち、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を利用する方法が原・岡崎らにより開発されている(Hara, I. and Okazaki, M., *Methods in Enzymology*, 129, pp. 549-557, 1986; 総説として、岡崎ら“膜脂質と血漿リポタンパク質・下(続生化学実験講座3)”, 日本国化学会編, p. 632, 株式会社東京化学同人発行、1986年)。

【0008】HPLCを利用する上記の方法は、HPLC用ゲル濾過カラム(TSK-GEL, 東ソー株式会社製)に少量の未処理血清を注入し、血清成分を粒子サイズによって分離した後、リポ蛋白に含まれるコレステロールやトリアシルグリセロールを生化学的に分析して(ポストカラム法)、リポ蛋白に含まれるコレステロールやトリアシルグリセロールの量を分析することを特徴としている。この方法は、超遠心を利用する分析方法に比べて、極めて少量の血清試料で短時間に分析を行うことができるうえ、熟練を要せずに再現性よく分析を行うことができるという利点を有している。もっとも、コレステロールについては極めて信頼性の高い定量分析結果が得られることが知られているが(岡崎三代、検査と技術、22(13), pp. 1055-1061, 1994)、トリアシルグリセロールについては定量性に問題があることが指摘されている(Hara, I. and Okazaki, M., *Methods in Enzymology*, 129, p. 549-557, 1986)。

【0009】また、従前のHPLC法では、リポ蛋白が疎水性を有するためにHPLC用ゲル濾過カラムに非特異的に吸着されてしまい、定量性が損なわれるという問題があった。しかしながら、最近では、ゲル濾過剤(HPLC用カラム充填剤)の改良と非特異的吸着を抑制する溶媒系の開発が行われており、定量性の問題も克服されている。この結果、検出感度の大幅な向上と分析時間の短縮が可能になり、臨床検査法として実用化されるに至っている(セパレーションレポート、No. 087、東ソー株式会社、1994年)。

【0010】さらに、HPLC法では個々の分画を溶出時間で特定せざるを得ないという問題があり、加えて、用いるカラムの種類や溶離液の種類、あるいは流速などの種々の条件によってリポ蛋白の溶出時間が異なるので、異なる条件下で得られた分析結果を直接比較することができないという問題があった。しかしながら、この問題点についても、岡崎らにより提案された「サイズパラメーター」(ピーク検出時間と全分析時間から算出したリポ蛋白のサイズを表す値)により、溶出時間と粒子サイズを相関させることができるようになり、データの客観性が担保されるようになっている[(a) 「HPLCプロファイリングと脂質代謝異常」、第34回日本臨床化学会年会パネ

ルディスカッション1(平成6年11月4日、東京)；
(b) 岡崎三代、検査と技術、22(13), pp. 1055-1061, 1994]。

【0011】HPLC法では、カラムから溶出されてくるリポ蛋白は、主として溶出時間の短い大サイズリポ蛋白と溶出時間の長い小サイズリポ蛋白の2大分画に分離されている。小サイズリポ蛋白分画はHDL分画にほぼ一致しており、一方、大サイズリポ蛋白分画には、CM、VLDL、それらの代謝産物(レムナント)、およびLDL等が含まれている。従って、大サイズリポ蛋白分画をさらに2ないし3分画して定量することにより、CM、VLDL、及びLDLに含まれるコレステロールを定量しようとする試みがなされている。しかしながら、リポ蛋白中のトリアシルグリセロールの分析については、上記のような定量性の問題から、未だ実用的な段階には至っていない。

【0012】HPLC法や超遠心法などの従来のリポ蛋白分析法は、連続的な粒子サイズ(あるいは超遠心法の場合には比重)を有するリポ蛋白の集合体(すなわち混合物)から、単にCM、VLDL、LDL、HDLなどの分画に相当するリポ蛋白を分け、特定の範囲の粒子サイズ(あるいは比重)に含まれるリポ蛋白の混合物のコレステロールあるいはトリアシルグリセロールの総量を定量するものである。このために、医師が診断の際に利用できる血清リポ蛋白の分析データは、CM、VLDL、LDL、HDLの各コレステロール量(いずれも分画の総量)；及びCM、VLDL、LDL、HDLの各トリアシルグリセロール量(いずれも分画の総量)の数値として表現されている。このような分析結果を基にした診断方法は、血清リポ蛋白に含まれるコレステロール及びトリアシルグリセロールの量を診断に利用してはいるが、非常に大雑把に分画したリポ蛋白に含まれるコレステロール及びトリアシルグリセロールの総量を診断の材料にしているものにすぎない。

【0013】このような診断方法では、分画に含まれるリポ蛋白のコレステロール量やトリアシルグリセロール量(分画の総量)が一定の範囲内にあれば、リポ蛋白の性状に異常があってもリポ蛋白の代謝異常は発見できないという問題がある。例えば、分画内のどのような粒子サイズ(あるいは比重)のリポ蛋白が最大量のコレステロールあるいはトリアシルグリセロールを含んでおり、それが健常者のものに比べてどの程度相違しているのかというようなリポ蛋白の性状を示す情報は全く利用できなかった。

【0014】リポ蛋白代謝異常症の正確な診断のためには、患者の生体試料からリポ蛋白を分離し、リポ蛋白に含まれるコレステロール及びトリアシルグリセロールの分布から、リポ蛋白の特徴を把握することが必要である。従来、コレステロールについては、HPLC法によってリポ蛋白を粒子サイズに分離し、粒子サイズに対するコレステロールの分布からリポ蛋白代謝異常症のリポ蛋白を特徴付けた例が知られている[(a) 岡崎三代、「HPLC

プロファイリングと脂質代謝異常、第34回日本臨床化学会年会パネルディスカッション1（平成6年11月4日、東京）：(b) 岡崎三代、検査と技術、22(13), pp.1055-1061, 1994)】。しかしながら、リポ蛋白に含まれるコレステロール量及びトリアシルグリセロール量の両者から、リポ蛋白代謝異常症のリポ蛋白を二次元的に特徴づけた例は全く知られていない。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、リポ蛋白に含まれるコレステロールおよびトリアシルグリセロールを定量することにより、リポ蛋白代謝異常症の診断を簡便かつ正確に行う新規な方法を提供することを目的としている。より具体的には、本発明は、生体試料中に含まれるリポ蛋白の粒子サイズとコレステロール量及びトリアシルグリセロール量との関係から生体試料中リポ蛋白の特徴を把握し、リポ蛋白代謝異常症を簡便かつ正確に診断する方法を提供することを目的としている。

【0016】

【課題を解決するための手段】HPLCによるリポ蛋白の分析法の最も優れた特徴は、段階的な分画を繰り返さずに、広範囲の粒子サイズを有するリポ蛋白を一度に分離して、リポ蛋白の全体像を示す分布図を得ることができる。本発明者は、HPLC法の上記の特徴に着目し、生体試料に含まれるリポ蛋白を粒子サイズにより分離しつつ、リポ蛋白中のコレステロール及びトリアシルグリセロールを定量して、さらに生体試料中のリポ蛋白の粒子サイズとコレステロール量及びトリアシルグリセロール量との関係を表すリポ蛋白プロファイルを作製することにより、リポ蛋白代謝異常症を正確かつ簡便に診断できることを見出した。本発明は、これらの知見を下にして完成されたものである。

【0017】すなわち本発明は、(a) HPLCゲル濾過クロマトグラフィーによって生体試料、好ましくは血清中のリポ蛋白を粒子サイズの順に分離する工程、(b) 分離後のリポ蛋白に含まれるコレステロール及びトリアシルグリセロールの定量とを行う工程、及び(c) リポ蛋白の粒子サイズとコレステロール及びトリアシルグリセロールの含有量との関係を示すリポ蛋白プロファイルを得る工程を含む、リポ蛋白代謝異常症の診断方法を提供するものである。

【0018】本発明の別の態様によれば、上記発明の工程(c)に続き以下の工程(d)：上記工程(c)において得られたリポ蛋白プロファイルを健常者から得たリポ蛋白プロファイルと比較することによりリポ蛋白代謝異常症の疾患に特徴的なリポ蛋白の性状を把握する工程を含む上記方法；及び、上記工程(c)に続き、以下の工程：(d) 上記工程(c)において得られたリポ蛋白プロファイルを、健常者及び各種リポ蛋白代謝異常症の患者から得た複数の標準的リポ蛋白プロファイルを含むリポ蛋白プロファイル・ライブラリーと比較する工程が付加された

診断方法が提供される。

【0019】また、この発明の好ましい態様によれば、大サイズリポ蛋白分画と小サイズリポ蛋白分画を完全に分離した後に、リポ蛋白プロファイルをそれぞれ比較する上記診断方法も提供される。さらに本発明の別の態様により、HPLCゲル濾過クロマトグラフィーによって分離された生体試料中のリポ蛋白を粒子サイズと該分離後のリポ蛋白に含まれるコレステロール量及びトリアシルグリセロール量との関係を表すリポ蛋白代謝異常症診断用のリポ蛋白プロファイルが提供される。

【0020】HPLC法を用いた本発明の診断方法は、試料である生体試料をHPLCゲル濾過クロマトグラフィーに付し、分子ふるい効果によってリポ蛋白を粒子サイズに基づいて分離した後、粒子サイズの大きさの順に分離されたリポ蛋白中に含まれるコレステロールおよびトリアシルグリセロールをそれぞれ定量し、得られた各定量値とリポ蛋白の粒子サイズとの関係を表すリポ蛋白プロファイルを作成することにより、生体試料、好ましくは血清中リポ蛋白に含まれるコレステロールおよびトリアシルグリセロールの分布の特徴からリポ蛋白代謝異常症を診断することを特徴としている。例えば、リポ蛋白代謝異常症が疑われる患者から採取した血清からリポ蛋白プロファイルを作成し、健常者の平均的リポ蛋白プロファイル、あるいは健常者のリポ蛋白プロファイル及び各種のリポ蛋白代謝異常症の患者のリポ蛋白プロファイルを含むリポ蛋白プロファイル・ライブラリーと比較検討することにより、リポ蛋白代謝異常症の診断を正確かつ簡便に行うことができるので、本発明の方法は極めて有用である。

【0021】本発明の方法に用いる分析装置は、HPLCによるゲル濾過クロマトグラフィーを可能にするものならばいかなるものを用いてもよい。例えば、従来公知のHPLCによるリポ蛋白の自動分析装置をそのまま用いることが可能である。このような分析装置については、複数の公知刊行物 [(a) Okazaki, M., et al., High Performance Liquid Chromatography of Serum Lipoprotein, CRC Handbook of Chromatography, Analysis of Lipids, pp. 101-114, CRC Press, Inc., 1993; (b) Kieft, K. A., et al., Journal of Lipid Research, 32, 860, 1991; (c) Separation Note, No. 51, 東ソー株式会社, 1994年; (d) Separation Report, No. 87, 東ソー株式会社, 1994年; (e) 臨床化学, 23(3), pp. 236-242, 1994]に詳細な方法と具体例が説明されているが、本発明の方法に利用可能な装置はこれらに限定されることはない。

【0022】本発明の方法に用いることができる好ましいHPLC分析装置の概略を図1に示す。図1の装置では、オートサンプラーにセットされた血清がカラムに注入され、ポンプ1から送液される溶離液によってリポ蛋白が粒子サイズの大きさの順に分離される。その後、カラムからの溶出液中にポンプ2から酵素試薬を連続的に送り

込み、リアクター内で発色させてコレステロールを検出し、溶出時間とコレステロール量を示すクロマトグラムが自動的に作成されるようになっている。このような装置をそのまま用いてトリアシルグリセロールの定量を行うことができる。なお、トリアシルグリセロールの定量は同一の試料を用いて別途に行ってもよいが、図1に示す装置において、カラムからの溶出液を二手に分配して、コレステロール検出用のリアクターとトリアシルグリセロール検出用のリアクターに送り込み、一度の操作でコレステロールおよびトリアシルグリセロールを同時に定量することも可能である。

【0023】上記のHPLCによる分離操作では、生体試料、好ましくは血清に前処理を施した後にクロマトグラフィーに付することもできるが、前処理を行わずに分離操作に付すことも可能である。前処理工程としては、例えば、リポ蛋白に特異的な抗体を用いて特定のリポ蛋白成分を吸着させる工程、又は、特定の比重の分画を予め超遠心法などの手法により分離する工程などを挙げることができる。これらの前処理方法の具体例の詳細及びその効果は本明細書の実施例に記載されているが、本発明の方法に採用される前処理はこれらに限定されることはなく、本発明の方法により精度よくリポ蛋白代謝異常疾患が診断できる限りいかなる前処理工程を採用してもよい。

【0024】カラムの充填剤であるゲル濾過剤としては、広い範囲の粒子サイズを有するリポ蛋白の分離を可能にするものならば、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシメタクリレート、及びその他の親水性樹脂などのポリマー系ゲル濾過剤やシリカゲル系ゲル濾過剤などのいかなるゲル濾過剤を用いてもよい。例えば、ポアサイズ（平均細孔径）が200～3,000、より具体的には、約200程度、約400程度、約1,000程度、又は約3,000程度、さらに好ましくは900～1,100オングストローム程度のものを好適に用いることができる。もっとも、本発明の方法により的確な診断を行うためには、少なくとも大サイズリポ蛋白と小サイズリポ蛋白とが十分に分離され、特に、小サイズリポ蛋白が大サイズリポ蛋白から完全に独立したピークを与えるようなカラムを選択すべきである。このようなゲル濾過剤を充填したHPLC用カラムは市販のものをそのまま用いることができる。例えば、単一の種類のカラムを1または2以上用いてもよいが、種類の異なる2以上のカラムを組み合わせて用いてもよい。一例を挙げれば、東ソー株式会社から市販されているTSKgel Lipopropak（セパレーションレポート、No.087、東ソー株式会社、1994年）などは、本発明の方法のために特に好ましいHPLCカラムである。

【0025】リポ蛋白を分離するための溶離液としては、広い範囲の粒子サイズを有するリポ蛋白の分離を可能にするものならばいかなるもの用いてもよく、例えば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、ビスーストリス緩衝液

等を用いることができる。緩衝液の濃度は特に制限されないが、一般的には、十分な緩衝能を有しており、かつ、コレステロール及びトリアシルグリセロールの検出（ポストカラム反応）を阻害しないなどの特性が要求されるので、例えば、20～200 mM、好ましくは50～100 mM程度の濃度にすることが一般的である。緩衝液のpHも特に限定されないが、例えば、ポストカラム反応を阻害しないような5～9、好ましくは7～8の範囲とすればよい。好ましくは、大サイズリポ蛋白と小サイズリポ蛋白が完全に分離されるような条件を選択すべきである。

【0026】また、カラムの充填剤に対するリポ蛋白の非特異的吸着を抑制するような溶離液を用いることが好ましい。このような溶出液として、例えば、東ソー株式会社から入手可能なTSKgel Lipopropak（セパレーションレポート、No.087、東ソー株式会社、1994年）などを好適に用いることができる。なお、分析装置、ゲル濾過剤、HPLC用カラム、及び溶離液は、例示のものに限定されることなく、本発明の方法を実施する目的や生体試料の種類、分析装置の種類などに応じて適宜選択することが可能である。また、カラムの容量に応じて、流速は広い範囲で選択することが可能である。

【0027】血清中のコレステロール及びトリアシルグリセロールはリポ蛋白にのみ含まれているので、大きさの順にカラムから溶出してくる血清リポ蛋白のコレステロール及びトリアシルグリセロールを連続的に検出して得られるクロマトグラムは、種々の粒子サイズを有するリポ蛋白に含まれるコレステロール量及びトリアシルグリセロール量を反映している。また、カラムに注入された試料は、ほぼ100%回収されるので、カラムにより分離したパターン（クロマトグラム）の全面積からコレステロール及びトリアシルグリセロールの血清中の総量を定量することができる。

【0028】コレステロールの定量には、例えば、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、パーオキシダーゼなどの酵素を、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン、4-アミノアンチピリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-m-アニシジンなどの色素と組み合わせた酵素-色素試薬を用いることができる。これらの試薬は、コレステロールと反応して、蛍光検出器や紫外可視検出器などの分光器で検出可能な蛍光や吸収を有する反応生成物を与える。例えば、市販のデタミナーレーザー（協和メデックス株式会社）やコレスカラー・リキッド（東洋紡株式会社）などの試薬を好適に用いることができる。

【0029】トリアシルグリセロールの定量には、例えば、リポプロテインリパーゼ、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、又はパーオキシダーゼなどの酵素を、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミンや4-アミノアンチピリンなどの色素と組み合わせた酵素-色素試薬を用いることができる。これらの試

薬は、トリアルギリセロールと反応して、蛍光検出器や紫外可視検出器などの分光器で検出可能な蛍光や吸収を有する反応生成物を与える。例えば、市販のデタミナーレ TG (協和メデックス株式会社製)などの試薬を好適に用いることができる。これらの試薬とコレステロールおよびトリアルギリセロールの反応は、例えば35~50°C、好ましくは37~45°C程度の温度で行えばよい。

【0030】図1に示す装置を用いてリポ蛋白を分離し、コレステロールを定量した場合に得られたクロマトグラムの一例を図2に示す。分析条件は以下のとおりである。カラム: TSKgel Lipopropak (東ソー株式会社) 7.5 mm I.D. × 30 cm; 溶離液: TSKeluent LP-1 (東ソー株式会社); 流速: 0.6 ml/min (溶離液), 0.225 ml/min (反応液: デタミナーレ TC R-1, 協和メデックス株式会社), 0.075 ml/min (反応液: デタミナーレ TC R-2, 協和メデックス株式会社); 温度: 室温 (カラム), 45°C (ポストカラム反応); 反応コイル: 反応コイルK (0.4 mm I.D. × 7.5 m); 検出: VIS (550 nm); 試料: 管理血清 (5 μl)。同様にしてトリアルギリセロールを定量したクロマトグラムを得ることができる。

【0031】上記のようなHPLCによってリポ蛋白を粒子サイズの順に分離し、コレステロール (又はトリアルギリセロール) の定量した場合、一般的には、図2に示したように、横軸に時間、縦軸にコレステロール (又はトリアルギリセロール) の量を示すクロマトグラムが得られる。両者のクロマトグラムが実質的に同一の条件下で得られた場合には、両者のクロマトグラムを重ね合わせることによってリポ蛋白プロファイルを作製し、本発明の診断方法に用いてもよい。通常、溶出時間が短いほどリポ蛋白の粒子サイズが大きいので、上記のリポ蛋白プロファイルの横軸 (溶出時間) をリポ蛋白の粒子サイズの指標として考えることにより、上記のリポ蛋白プロファイル (横軸: 溶出時間; 縦軸: TCおよびTG量) からリポ蛋白の粒子サイズとコレステロール及びトリアルギリセロール量との関係を読み取ることが可能である。

【0032】もっとも、溶出時間とリポ蛋白の粒子サイズの間には明確な直線関係が存在しない場合もあるので、溶出時間をリポ蛋白の粒子サイズと読み換えることに問題が生じる可能性がある。また、このようなリポ蛋白プロファイル (横軸: 溶出時間; 縦軸: TCおよびTG量) を、全く別な分析装置により得られた健常者のリポ蛋白プロファイルと比較検討することは困難な場合がある。従って、各クロマトグラムからリポ蛋白プロファイルを作成する際には、横軸の溶出時間をリポ蛋白の粒子サイズを示す客観的な指標に変換することが望ましい。

【0033】例えば、各クロマトグラムの横軸 (溶出時間) をサイズパラメーター (ピーク検出時間と全分析時間から算出したリポ蛋白のサイズを表す値: (a) 岡崎三代、「HPLCプロファイルリングと脂質代謝異常」、第34回

日本臨床化学会年会パネルディスカッション1、平成6年11月4日、東京: (b) 岡崎三代、検査と技術、22(1) 3, pp. 1055-1061, 1994) に換算することにより、本発明の方法に好適なリポ蛋白プロファイルを作成することができる。例えばサイズパラメーターを 100- (ピーク時間- 分析開始時間) / 全分析時間 × 100 として横軸を換算した後、横軸をサイズパラメータ (100-0) 、縦軸をコレステロール量及びトリアルギリセロール量として表した本発明のリポ蛋白プロファイルを得ることができる。

【0034】上記のような換算を行うことにより、コレステロール及びトリアルギリセロールについて得られたそれぞれのクロマトグラムを一層精度よく結び付け、リポ蛋白の粒子サイズとコレステロール及びトリアルギリセロールの含有量との関係を示すリポ蛋白プロファイルを作製することができる。なお、サイズパラメーターは上記のものに限定されず、溶出時間を粒子サイズに変換でき、種々のデータの互換性を担保できるものならばいかなるものを採用してもよい。

【0035】本発明の診断方法は、哺乳類動物から分離採取した生体試料、例えば血清を用いて上記のようなリポ蛋白プロファイルを作成することによって、血清中リポ蛋白の性状をコレステロール量およびトリアルギリセロール量の分布から特徴付けることを特徴としている。さらに、得られたリポ蛋白プロファイルを、例えば、健常者から得たリポ蛋白プロファイルと比較することにより被検者のリポ蛋白プロファイルの特徴 (健常者のものとの相違点) を把握するか、あるいは、被験者のリポ蛋白プロファイルを、予め作成したリポ蛋白プロファイル・ライブラリーの各構成要素と比較することにより、被験者のリポ蛋白プロファイルと類似または一致するリポ蛋白プロファイルを与える疾患を見いだして疾患名を特定することにより診断を行うものである。従って、本発明の診断方法は、コレステロール量及びトリアルギリセロール量の分布という二次元的な情報から血清中リポ蛋白を特徴付け、リポ蛋白代謝異常症を正確に診断しようとするものである。

【0036】個々の生体試料からのリポ蛋白プロファイルは上記のリポ蛋白プロファイルの作成方法に従って得ることができ、予め健常者から採取した生体試料を用いて作成したリポ蛋白プロファイルと比較することによってもリポ蛋白代謝異常疾患を診断することができるが、被験者のリポ蛋白代謝異常疾患を正確かつ簡便に診断を可能にするためには、種々の疾患のリポ蛋白プロファイルを集積したリポ蛋白プロファイル・ライブラリーを作成しておくことが望ましい。このようなリポ蛋白プロファイル・ライブラリーに集積されたリポ蛋白代謝異常疾患の特徴的なリポ蛋白プロファイルと被験者のリポ蛋白プロファイルとを重ね合わせて比較することによって、より簡便な診断が可能になる。

11

【0037】このような個々の疾患のリポ蛋白プロファイルの例及びリポ蛋白プロファイル・ライブラリーの例(実施例2)を以下の実施例に示したが、本発明の方法に用いるリポ蛋白プロファイル・ライブラリー及びリポ蛋白プロファイルはこれらに限定されることはない。また、健常者のリポ蛋白プロファイルとしては、例えば、10~100例以上の健常者から得たリポ蛋白プロファイルを平均して健常者の平均的リポ蛋白プロファイルを作成し、本発明の診断方法に用いることができる。健常者は、例えば $TC < 200 \text{ mg/dl}$ かつ $TG < 80 \sim 100 \text{ mg/dl}$ かつ $40 < HDL < 80 \text{ mg/dl}$ (絶食時) の範囲の者を選択することができる。

【0038】本発明の診断方法に従って被検血清から得たリポ蛋白プロファイルと標準リポ蛋白プロファイルとを比較する際には、粒子サイズの分布の全般にわたって比較を行ってもよいが、大サイズリポ蛋白分画と小サイズリポ蛋白分画のそれぞれの分画について比較を行うことが好ましい。コレステロール及びトリグリセリドのそれぞれについて以下の項目の全てあるいはその一部について比較を行うことが好ましいが、比較すべき項目は以下に例示するものに限定されることはない。

【0039】大サイズリポ蛋白(CM, VLDL, LDL)のそれあるいはその組み合わせ、 $CM+VLDL$ と LDL 、 CM と $VLDL+LDL$ 、 $CM+VLDL+LDL$ と小サイズリポ蛋白(HDL)の定量値(mg/dl)の比較、あるいは谷分割または時間分割による定量値又はピークのシュミレーションによる各分画の定量値の比較；上記の方法のいずれかあるいは全ての方法により分画した各分画の $TG\% (=TG \div (TG+TC) \times 100)$ ；各ピーク、例えば大サイズリポ蛋白(CM, VLDL, LDL)と小サイズリポ蛋白(HDL)のサイズ；大(小)サイズリポ蛋白の平均サイズパラメーター(面積が $1/2$ の位置)； TC と TG の平均サイズパラメータの乖離(TG のサイズ $\div TC$ のサイズ $\times 100$)；大(小)サイズリポ蛋白乖離；小サイズリポ蛋白のピーク幅；大サイズリポ蛋白、又は CM , $VLDL$, IDL , LDL 単独のピーク幅；各ピークの高さ；ピークに含まれるリポ蛋白成分の不均一性(各ピークの面積 \div 各ピークの高さ)；ピークの対称性(ピーク・トップの右側と左側の面積の比)；及び各ピーク間の谷の高さ。

【0040】以下の実施例に、本発明の方法に従ってリポ蛋白代謝異常症を診断するための具体的方法を示すが、これらの例に示される判断基準は本発明の方法の一

例2：高脂血症の型分類

I型高脂血症(1)	$TC=557 \text{ mg/dl}$, $TG=4629 \text{ mg/dl}$
I型高脂血症(2)	$TC=370 \text{ mg/dl}$, $TG=4240 \text{ mg/dl}$ LPL 欠損症
IIa型高脂血症	$TC=662 \text{ mg/dl}$, $TG=142 \text{ mg/dl}$ FH (ホモ接合体)
IIb型高脂血症(1)	$TC=322 \text{ mg/dl}$, $TG=350 \text{ mg/dl}$
IIb型高脂血症(2)	$TC=303 \text{ mg/dl}$, $TG=258 \text{ mg/dl}$
III型高脂血症	$TC=270 \text{ mg/dl}$, $TG=164 \text{ mg/dl}$
IV型高脂血症(1)	$TC=209 \text{ mg/dl}$, $TG=320 \text{ mg/dl}$

例として説明するものであり、熟練した医師や当業者が、これらの判断基準に拘泥することなく、診断の目的や分析装置などの諸条件に応じて適宜の判断基準を採用すべきことはいうまでもない。

12
【0041】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。

例1：リポ蛋白の分離(健常者の平均的リポ蛋白プロファイルの作成)

図1に示す装置により、未処理血清($5\mu\text{l}$)の分離を行った。分析カラムとして市販の TSKgel Lipopropak (東ソー株式会社：内径7.5 mm、全長60 mm)、試料注入として AS-8020 (東ソー株式会社)、検出器として UV-8010 (東ソー株式会社) を用いた。検出波長は 550 nm とした。リアクターとして反応オープン CO-8020 (東ソー株式会社) 内に反応コイルK (東ソー株式会社、内径 0.4 mm、全長 7.5 m 又は 10 m) を設置して 45°C または 37°C で反応を行った。

【0042】ポンプ1(送液用)としてCCPM(東ソー株式会社)を用い、溶離液としてTSKgel LP-1又はLP2を用い流速を 0.6 ml/min とした。ポンプ2としてCCPM(東ソー株式会社)を用い、検出用試薬としてTCについてはデタミナーL TC R-1(協和メデックス株式会社、0.225 ml/min)とデタミナーL TC R-2(協和メデックス株式会社、0.075 ml/min)、TGについてはデタミナーL TG R-1(協和メデックス株式会社、0.225 ml/min)とデタミナーL TG R-2(協和メデックス株式会社、0.075 ml/min)のリポプロテインリバーゼを2単位から10単位に強化したもの(協和メデックス株式会社、0.075 ml/min)を用いた。

【0043】上記のような装置と条件を用いて、健常者から採取した血清中のリポ蛋白を分離し、リポ蛋白の溶出時間とTC量(図2)またはTG量を示すクロマトグラムをそれぞれ作成した。このクロマトグラムの横軸(溶出時間)をサイズパラメーター [$100 - (ピーク時間 - 分析開始時間) \div (全分析時間 \times 100)$] に換算した後、両者のサイズパラメーターが同一になるように重ね合わせて、健常者($TC=165 \text{ mg/dl}$, $TG=84 \text{ mg/dl}$)のリポ蛋白プロファイルを作成した(図3：図中、TC——; TG: --- を示す)。

40
【0044】

IV型高脂血症(2)	TC=253 mg/dl, TG=542 mg/dl
V型高脂血症(1)	TC=268 mg/dl, TG=887 mg/dl
V型高脂血症(2)	TC=279 mg/dl, TG=794 mg/dl

【0045】高脂血症の各型について、分析カラムとしてLipopropak (LP: 30cm/東ソー) を2本又はLipopropak XL (XL: 30cm/東ソー) 1本で血清を分離後、TC(—) とTG(---) でモニターした。各高脂血症のリポ蛋白プロファイルを図4～8に示す。図4a及びbはそれぞれI型高脂血症の例を示し、図5a及びbはそれぞれIIb型高脂血症の例を示し、図6a及びbはそれぞれIV型高脂血症の例を示し、図7a及びbはそれぞれV型高脂血症の例を示し、図8a及びbはそれぞれIIa型高脂血症及びIII型高脂血症の例を示す。これらは本発明のリポ蛋白プロファイル・ライブラリーの一例である。

【0046】縦軸のTC量とTG量はI型では1/16にIIa型では1/3に縮小してある。血清TG値が非常に高く超乳びでカイロミクロンが著しく増加するI型は、LPL欠損症I型(図4b) のようにカイロミクロンのみ増加する場合とVLDLもかなり増加する場合I型(図4a) とがあること*

例3：診断例

検体3-1 CETP完全欠損症の例	TC=211 mg/dl, TG=44 mg/dl
検体3-2 高HDL血症の例	TC=272 mg/dl, TG=64 mg/dl
検体3-3 マウス(眼窓採血の血漿)の例	

分析カラムとしてLipopropak (30cm/東ソー) を2本接続して用い、血清を分離後、TC(—) とTG(---) でモニターした。図9a～cにそれぞれ検体3-1～3-3のリポ蛋白プロファイルを示す。

【0047】いずれの検体もTCモニターでは小サイズリポ蛋白の量が多く(検体3-1: 145 mg/dl、検体3-2: 142 mg/dl、検体3-3: 90 mg/dl)、かつサイズも大きい(検体3-1: 33.5、検体3-2: 33.1、検体3-3: 30.5)ことが分かった。TGモニターではCETP欠損症ではこの乖離を診断の基準とすることができた。TCモニター、TGモニターそれぞれの場合の大サイズリポ蛋白の平均粒子サイズ(面積が1/2の位置)を求め、TGの平均粒子サイズ÷TCの平均粒子サイズ×100をサイズ乖離と定義すると、検体3-1では約106、第二のグループ(2)では約120となり、より大きな大サイズリポ蛋白のサイズ乖離も第二のグループの方に見られた。II型では大サイズリポ蛋白のサイズ乖離は小さく、正常例やIIa型に比べてサイズパラメーターが大きかった。

*が判る。カイロミクロンとVLDLが増加するV型、VLDLが増加するVI型、LDLが増加するIIb型では、それぞれVLDLのサイズパラメーターによって大きく2グループに分けることができた。第一のグループ(1)はVLDLのサイズパラメーターが比較的小さく(約66～71)、第二のグループ(2)は比較的大きかった(約70～78)。またTCモニター、TGモニターそれぞれの場合の大サイズリポ蛋白の平均粒子サイズ(面積が1/2の位置)を求め、TGの平均粒子サイズ÷TCの平均粒子サイズ×100をサイズ乖離と定義すると、第一のグループ(1)では約106、第二のグループ(2)では約120となり、より大きな大サイズリポ蛋白のサイズ乖離も第二のグループの方に見られた。II型では大サイズリポ蛋白のサイズ乖離は小さく、正常例やIIa型に比べてサイズパラメーターが大きかった。

※34%及び3%、検体3-3では86%及び5%と大きく乖離したのに対し、検体3-2では21%と14%と乖離が少なかつた。CETP欠損症ではこの乖離を診断の基準とすることができた。TCモニター、TGモニターそれぞれの場合の大サイズリポ蛋白の平均粒子サイズ(面積が1/2の位置)を求め、TGの平均粒子サイズ÷TCの平均粒子サイズ×100をサイズ乖離と定義すると、検体3-1では97、検体3-2では101であり、CETP欠損症では大サイズリポ蛋白のサイズ乖離も見られた。なおTGは通常、TCに比べよりサイズの大きい大サイズリポ蛋白での含有率が高いと考えられるので、サイズ乖離が100以下はかなり異常と判断される。

【0048】

実施例4：治療経過

検体4-1 糖尿病	TC=216 mg/dl, TG=311 mg/dl, 空腹時血糖値(FBG)=163 mg/dl
検体4-2 糖尿病(3カ月後)	TC=197 mg/dl, TG=190 mg/dl, FBG=124 mg/dl
検体4-3 正常	TC=165 mg/dl, TG=84 mg/dl

分析カラムとしてLipopropak (30cm/東ソー) を2本接続して用い、糖尿病患者の治療経過の指標とするため、TCとTG(TG)でモニターした。図10はリポ蛋白プロファイルを示し、図中、a及びbはそれぞれTCとTGのプロファイルを示す。

【0049】糖尿病では、しばしば脂質代謝異常も伴っている。検体4-1(---)のTCモニターでは、正常(検体4-3:—)に比べると小サイズリポ蛋白の量が少なく

(検体4-1: 35 mg/dl、検体4-3: 57 mg/dl)、大サイズリポ蛋白のピーク幅が広かった(検体4-1: 17.3、検体4-3: 13.4)が、3カ月後(検体4-2: ----)もノバターンの変化はわずかであった(例: 大サイズリポ蛋白のピーク幅: 16.9)。ピークの対称性は(ピークトップの左側の面積÷右側の面積)、検体4-1: 1.67、検体4-2: 1.34、検体4-3: 1.01でピーク幅よりも治療経過の指標として優れている。TGモニターでは、小サイズリポ蛋白

15

前の変化はほとんどなかったが、大サイズリポ蛋白は、量が 280 → 170 mg/dl、サイズパラメーターが 68.3 → 66.2 と大幅に改善されていた。これは、空腹時血糖値の改善も伴っており、糖尿病に伴った脂質代謝異常の治療*

実施例5：サイズパラメーターと各分画のTG%。

検体5 LPL 欠損症（食事療法）の例 TC=138 mg/dl, TG=725 mg/dl

分析カラムとしてLipopropak (LP: 30cm/東ソー) を2本接続した場合と、Lipopropak XL (XL: 30cm/東ソーノ) 1本の場合で、それぞれ血清を分離した後、TCとTGでモニターした。検体5及び健常者 (LP: 17例、XL: 38例の平均値) のそれぞれのカラム系でのサイズパラメーター

*経過の指標として、TC及びTGモニターを併せたリポ蛋白プロファイリングが有効であった。

【0050】

サイズパラメーター

		TC モニター				TG モニター			
		CM	VLDL	LDL	HDL	CM	VLDL	LDL	HDL
検体5	LP 60 cm	91.3	70.3	53.4	29.4	91.6	72.9	—	30.1
	XL 30 cm	90.5	69.3	53.2	30.3	92.3	73.0	—	30.7
健常者	n=17 ; LP 60 cm	90.4	—	56.3	30.3	90.7	68.8	58.2	30.1
	n=38 ; XL 30 cm	86.7	—	57.0	29.7	90.5	68.1	59.6	29.9

【表2】

TG%

		CM	VLDL	LDL	小サイズリポ蛋白
検体5	LP 60 cm	92	84	70	68
	XL 30 cm	92	88	69	70
健常者	n=17 ; LP 60 cm	24	—	—	22
	n=38 ; XL 30 cm	22	—	—	21

【0051】

実施例6：超遠心法（前処理）との組合せ

検体6-1 冠動脈狭窄がない（正常）例 TC=182 mg/dl, TG=91 mg/dl

検体6-2 冠動脈狭窄がある例 TC=196 mg/dl, TG=127 mg/dl

血清に比重1.063の超遠心分離を行い、その下層分画(d > 1.063)を分析カラムであるLipopropak XL (XL: 30cm/東ソー) で分離した後、TC(—)とTG(……)でモニターした。また、超遠心分離前の血清も同様にHPLCで分析して比較した。図11a及びbは、それぞれ検体6-1及び6-2についてのリポ蛋白プロファイルを示す図である。

【0052】検体6-1の下層分画のTCモニターでは3つのピークが観測され、3番目のピークは血清の小サイズリポ蛋白のピークと量及びサイズともに完全に一致した。2番目のピークは血清の大サイズリポ蛋白よりやや

40 サイズが小さく（血清：58.8、下層分画：56.3）、1番目のピークはサイズパラメーターが67.6とかなり大きかった。TGモニターでは1番目のピークはTCモニターの場合より小さく TG%がかなり低く(18.6%)、Lp(a)の可能性が考えられた。2番目のピークは血清の大サイズリポ蛋白に比べて TG%がやや低く（血清：40.9%、下層分画：35.5%）、比重が大きくてサイズが小さいLDLと考えられた。検体6-2の下層分画では1番目、2番目のピークはほとんどなく、この2種類のピークが、動脈硬化症と密接な関係があることが示唆された。1番目のピークのTC量(X)と比濁法による Lp(a)量(Y)と相関を検討

したところ、 $n=52$ 、 $Y=4.96X+9.56$ 、 $r=0.912$ で非常に高い相関が得られた。

実施例7：モノクローナル抗体処理（前処理）との組み合わせによる異常リポ蛋白の分析

検体7-1 Lp-Xがある例 TC=400 mg/dl, TG=86 mg/dl, アポE=43.9 mg/dl

検体7-2 Lp-Xがある例 TC=886 mg/dl, TG=273 mg/dl, アポE=17.7 mg/dl

血清TG値がTCと比べて相対的に低く血清アポE値が異常高値を示す血清を分析カラムであるLipopropak XL (XL: 30cm/東ソー) 又はLipopropak (LP: 30cm×2本/東ソー) で分離後、TC (—) とTG (---) でモニターした。血清をモノクローナル抗アポA-I 及び抗アポB抗体 (RLP-コレステロール「JIMRO」、日本抗体研究所) で吸収した上清分画 (RLP分画) をTC (---) でモニターした。検体7-1 及び7-2 についての結果を図12a 及びb に示す。

【0054】検体7-1 の RLP分画では血清の大サイズリポ蛋白と小サイズリポ蛋白の中間の位置にピークが観測され (サイズパラメーター: 40.5)、異常リポ蛋白成分が多量に存在することが分かった。血清のTCモニターでは大サイズリポ蛋白と小サイズリポ蛋白のピークの間の“谷”的高さが高く異常成分の存在が示唆されたが、TGモニターではそのサイズの成分はなかった。同様に検体7-2 では RLP分画にサイズパラメーター: 74.9 の位置に異常成分が多量に残り、血清のTGモニターでは、TGをほとんど含まないTC主体の成分であることが分かった。

【0055】実施例8：ポリクローナル抗体処理（前処理）との組み合わせによる異常リポ蛋白の分析

検体8-1 IV型高脂血症 TC=245 mg/dl, TG=629 mg/dl

検体8-2 IV型高脂血症 TC=236 mg/dl, TG=422 mg/dl

血清を LDL以外のリポ蛋白を吸収するポリクローナル抗体 (「LDL-CHOLESTEROL」、シグマ社) で吸収した濾液分画 (LDL分画) を分析カラムであるLipopropak (LP: 30cm×2本/東ソー) で分離後、TC (—) とTG (---) でモニターした。また、分画前の血清のTGモニター (---) も併せて示した。検体8-1 及び8-2 についての結果を図13a 及びb に示す。

【0056】IV型高脂血症の検体8-1 の LDL分画では、TCモニターとTGモニターのピークが一致し (サイズパラメーター: 53.0)、対称性も良く (TCモニターのピークトップの左側の面積/右側の面積: 1.07) LDL以外の成分が良く吸収されていた。検体8-2 では LDL分画のTCモニターとTGモニターのピークは一致せず (サイズパラメーター: 57.3 と 66.1)、ピークの対称性 (1.93) が非常に悪かった。この2検体を比較すると、TGモニターのピークのサイズパラメーターが検体8-1: 75.9、検体8-2: 70.2 であり、また大サイズリポ蛋白のTG% がそれぞれ 73%、65% と大きく違い、リポ蛋白の質の違いを反映していると考えられた。

【0057】

【発明の効果】本発明の診断方法は、血清に含まれるリ

* 【0053】

*

実施例7：モノクローナル抗体処理（前処理）との組み合わせによる異常リポ蛋白の分析

検体7-1 Lp-Xがある例 TC=400 mg/dl, TG=86 mg/dl, アポE=43.9 mg/dl

検体7-2 Lp-Xがある例 TC=886 mg/dl, TG=273 mg/dl, アポE=17.7 mg/dl

10 ポ蛋白から粒子サイズとTC量及びTG量との関係を表すリポ蛋白プロファイルを得ることにより、血清リポ蛋白の特徴を的確に把握することができ、リポ蛋白代謝異常症を正確に診断することができるので有用である。また、本発明の方法は極めて簡便に行うことができるという優れた特徴がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法を実施するために利用できるHPLCによる測定装置の概略を示した図である。

【図2】 HPLCにより分離されたリポ蛋白中のTCの分布 (横軸: 溶出時間; 縦軸: TC量) を示すクロマトグラムを示す図である。

【図3】 健常者の本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、—はTCを示し、---はTGを示す。

【図4】 本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、—はTCを示し、---はTGを示し、a 及びb はそれぞれI型高脂血症の例を示す。

【図5】 本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、—はTCを示し、---はTGを示し、a 及びb はそれぞれIIb型高脂血症の例を示す。

【図6】 本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、—はTCを示し、---はTGを示し、a 及びb はそれぞれIV型高脂血症の例を示す。

【図7】 本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、—はTCを示し、---はTGを示し、a 及びb はそれぞれV型高脂血症の例を示す。

【図8】 本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、—はTCを示し、---はTGを示し、a 及びb はそれぞれIIa型高脂血症及びIII型高脂血症の例を示す。

【図9】 本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、—はTCを示し、---はTGを示し、a: CETP完全欠損症、b: 高HDL 血症、及び c: マウス (眼窩採血の血漿) を示す。

【図10】 本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、a 及びb はそれぞれTCとTGのプロファイルを示し、—は正常、---は糖尿病、----は糖尿病 (3カ月後) を示す。

【図11】 本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、—はTCを示し、---はTGを示し、a 及びb は、それぞれ冠動脈非狭窄例及び狭窄例を示す。

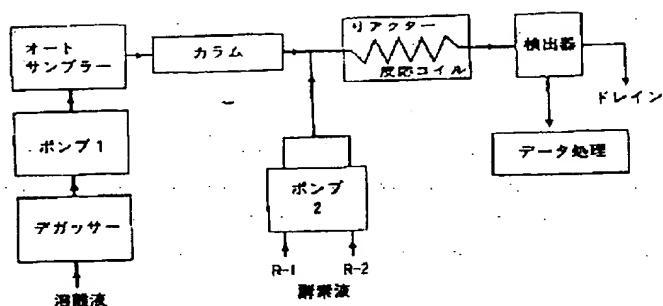
【図12】 本発明のリポ蛋白プロファイルを示す図である。図中、—はTCを示し、---はTGを示し、----は RLP 分画のTCを示し、a 及びb はそれぞれLp-Xがある例

を示す。

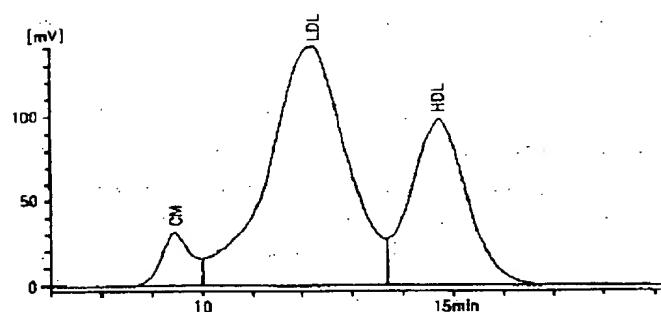
【図13】 本発明のリボ蛋白プロファイルを示す図である。図中、——はLDL分画のTGを示し、---はLDL 分

画のTGを示し、……は血清のTGを示し、a及びbはそれぞれV型高脂血症の例を示す。

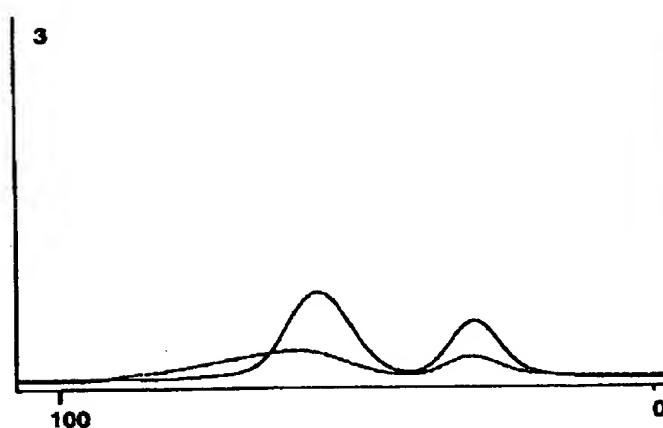
【図1】



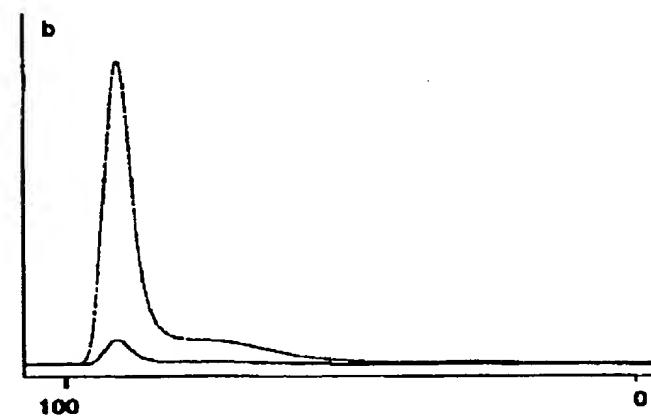
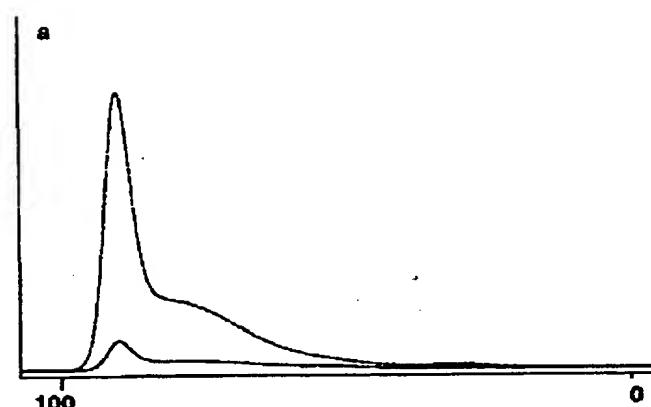
【図2】



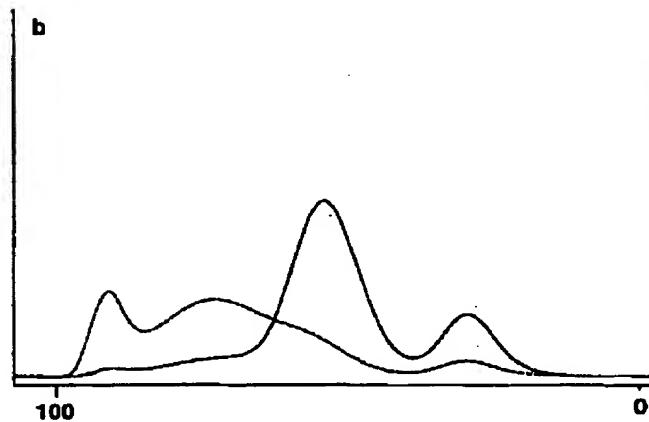
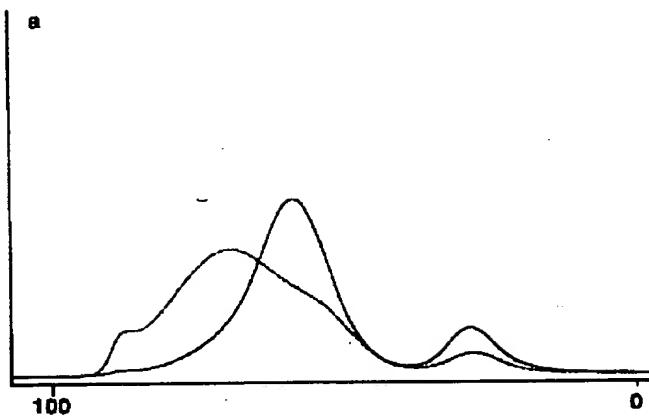
【図3】



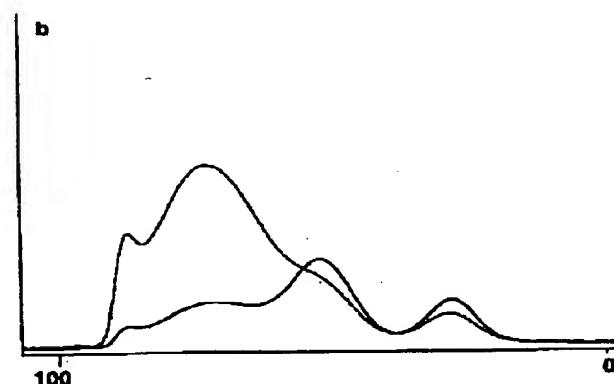
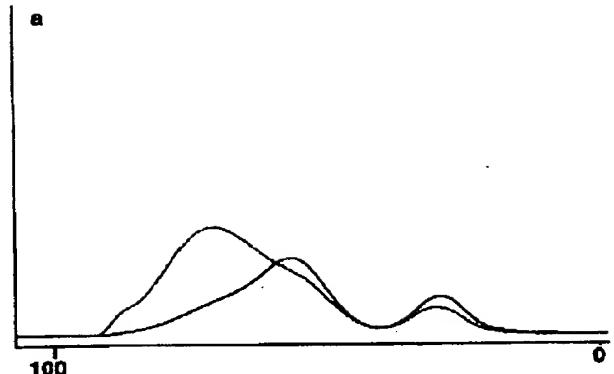
【図4】



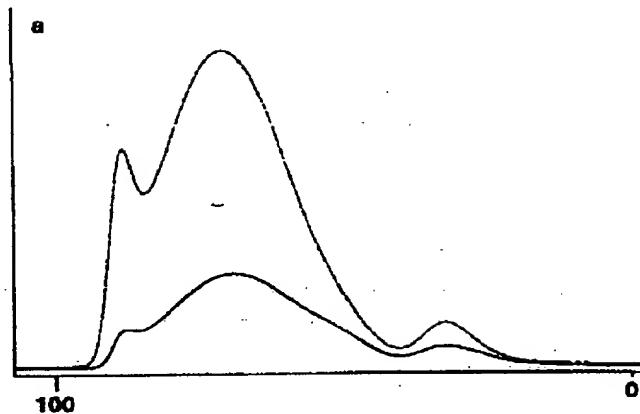
【図5】



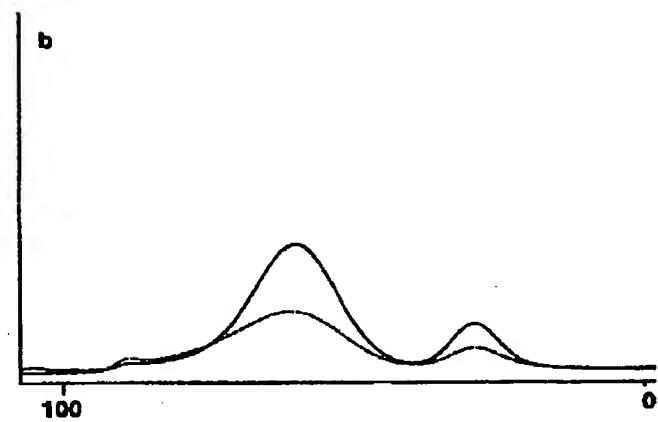
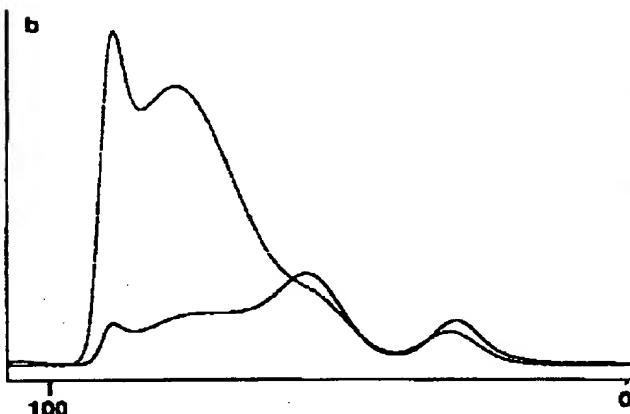
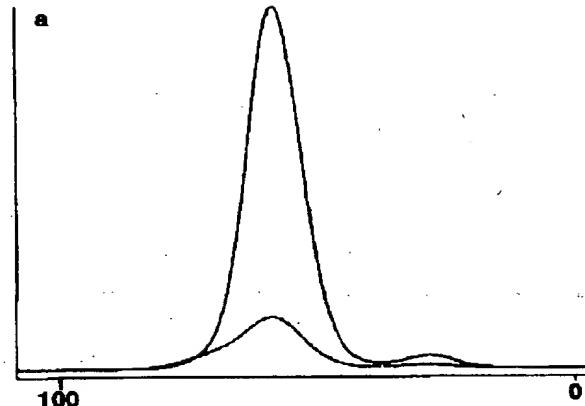
【図6】



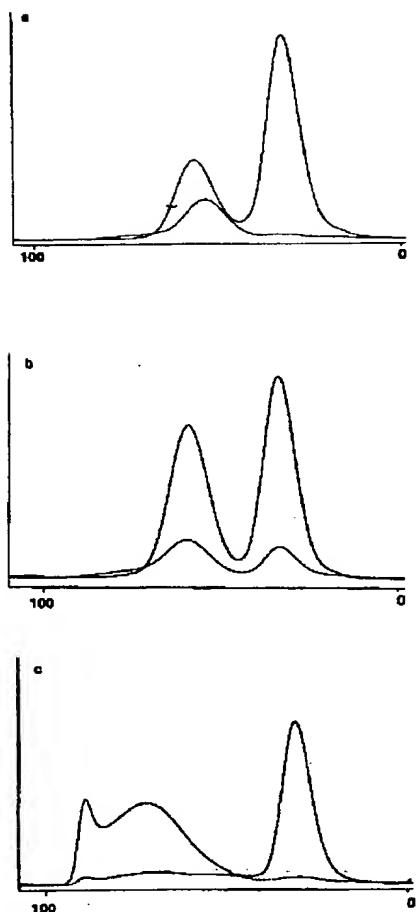
【図7】



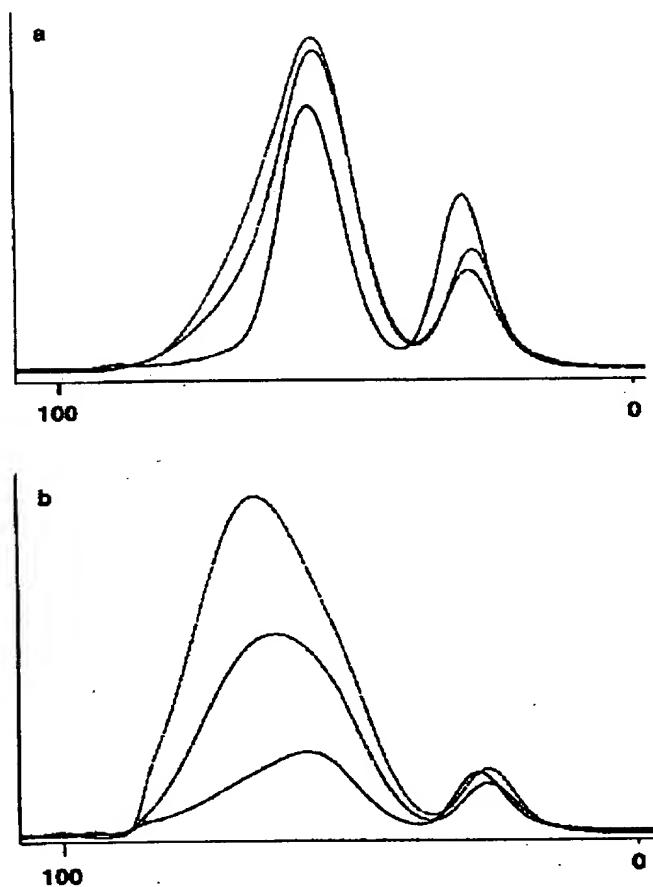
【図8】



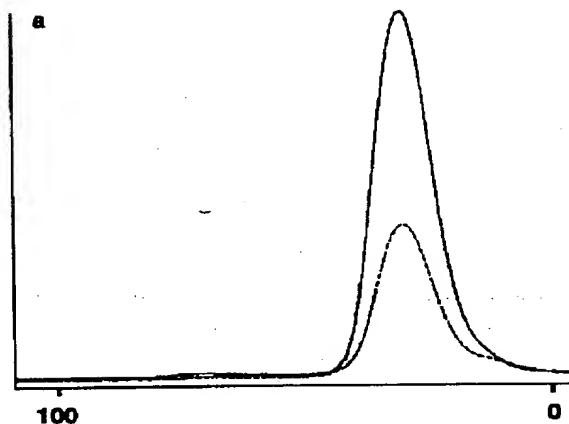
【図9】



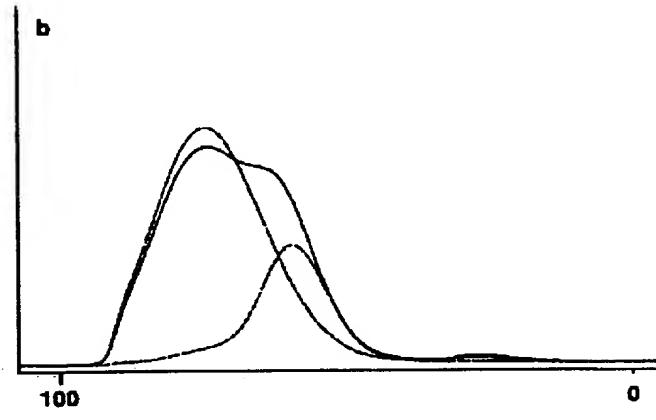
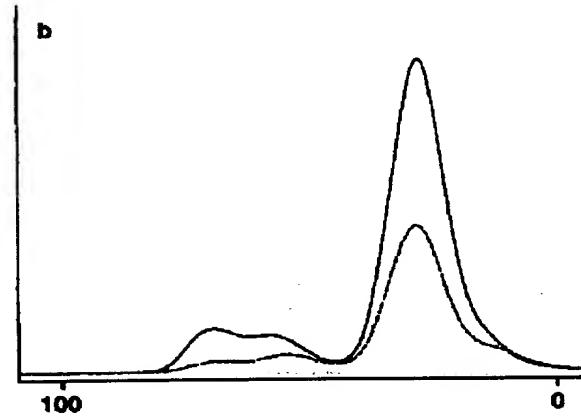
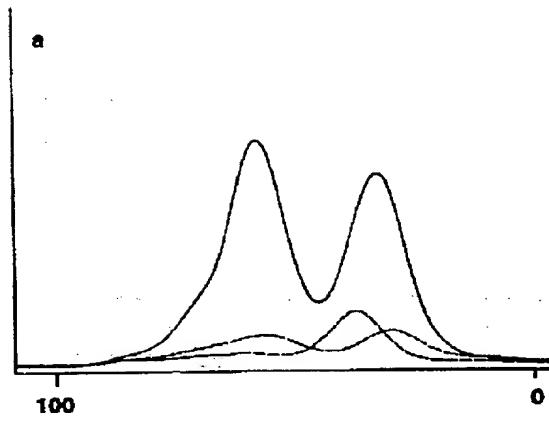
【図10】



【図1-1】



【図1-2】



【図13】

